



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

⑪ Numéro de publication:

0 105 777  
A1

⑫

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑬ Numéro de dépôt: 83401809.5

⑭ Date de dépôt: 15.09.83

⑮ Int. Cl.<sup>3</sup>: C 07 C 103/52  
C 08 G 69/08, C 09 K 3/34

⑯ Priorité: 22.09.82 FR 8215976

⑰ Date de publication de la demande:  
18.04.84 Bulletin 84/16

⑱ Etats contractants désignés:  
BE CH DE FR GB IT LI LU NL

⑯ Demandeur: Etablissement Public dit: CENTRE  
NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)  
15, Quai Anatole France  
F-75007 Paris(FR)

⑰ Inventeur: Gallot, Bernard René Maurice  
220 Rue Rodolphe Richard  
F-45160 Olivet(FR)

⑰ Inventeur: Douy, André  
269 Rue des Briandes  
F-45160 Olivet(FR)

⑯ Mandataire: Phélyp, Bruno et al,  
c/o Cabinet Harié & Phélyp 21, rue de la Rochefoucauld  
F-75009 Paris(FR)

BEST AVAILABLE COPY

⑲ Lipopeptides, leur obtention et leur application comme émulsifiants.

⑳ Les lipopeptides selon l'invention sont amphipatiques et  
sont constitués d'une chaîne hydrophobe comprenant de 8 à  
24 atomes de carbone environ et d'une chaîne peptidique  
hydrophile ou rendue hydrophile.

Applications notamment aux émulsions de milieux non  
miscibles et à l'obtention de cristaux liquides liotropes.

EP 0 105 777 A1

"Lipopeptides, leur obtention et leur application comme émulsifiants"

La présente invention concerne la synthèse de Lipopeptides, et plus particulièrement de Lipopeptides amphipatiques, et l'application de ces composés 5 comme émulsifiants ou comme cristaux liquides.

L'invention a pour premier objet une nouvelle classe de Lipopeptides, qui sont des Lipopeptides amphipatiques composés d'une chaîne hydrophobe comprenant au moins 8 atomes de carbone environ, et de préférence de 10 8 à 24 atomes de carbone environ, et d'une chaîne peptidique hydrophile ou rendue hydrophile.

Les Lipopeptides selon l'invention peuvent être définis par la formule générale:

C<sub>n</sub>PP

15 dans laquelle C<sub>n</sub> représente une chaîne hydrophobe ayant au moins 8 atomes de carbone environ, et de préférence 8 à 24 atomes de carbone environ, n désignant le nombre d'atomes de carbone, et PP représente un polypeptide obtenu à partir des acides aminés naturels ou de leurs 20 dérivés (de configuration l ou d, ). En pratique, le polypeptide PP est formé d'un ou plusieurs acides aminés, selon le degré de polymérisation retenu, ce dernier pouvant être de 1 ou plus. La nomenclature de certaines, parmi les plus courantes, des séquences peptidiques 25 qu'il est possible d'utiliser est regroupée plus loin dans le tableau I.

Par chaîne hydrophobe, on entend de préférence, mais non exclusivement, une chaîne hydrocarbonée aliphatique, éventuellement substituée, ayant un nombre d'atomes 30 de carbone tel qu'indiqué.

On a obtenu ces composés selon une technique elle-même nouvelle.

L'invention a donc également pour objet un procédé pour l'obtention de Lipopeptides amphipatiques 35 tels que définis ci-dessus, consistant fondamentalement à:

- 1) — réaliser un couplage peptidique entre une amine grasse et un amino acide N-protégé, pour obtenir un lipopeptide dont la chaîne peptidique a un degré de polymérisation de 1, et, si l'on désire obtenir un degré de polymérisation de 2 ou 3 pour la chaîne peptidique, réaliser un autre couplage peptidique d'un amino acide N-protégé sur le produit de degré de polymérisation immédiatement inférieur, ou
- 5 10 15 20 25 30 35 2a) — effectuer la polymérisation du N-carboxy-anhydride de l' amino acide en l'initiant par l'amine grasse  $C_nNH_2$ , pour obtenir des lipopeptides dont les chaînes peptidiques ont un degré de polymérisation qui dépendra des conditions opératoires choisies, et  
2b) — si on le désire, fractionner en composition les lipopeptides de l'étape 2a), et  
3) — excepté dans le cas où la chaîne peptidique du produit de l'étape 1) et/ou 2a) ou 2b) est directement une chaîne hydrophile, débloquer les chaînes latérales de la chaîne peptidique hydrophobe pour les rendre hydrophiles.

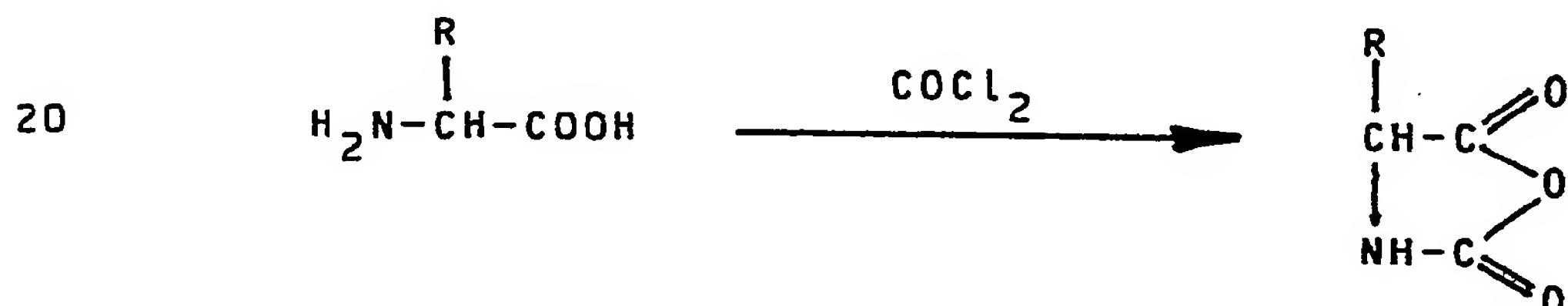
Pour obtenir des lipopeptides à degré de polymérisation 1, 2 ou 3, on procède par exemple par couplage peptidique entre l'amine grasse de formule  $C_nNH_2$ , où  $C_n$  est tel que précédemment défini, et l' amino acide dont l'atome d'azote amino est protégé, par exemple par le groupement tert-butyl-oxycarbonyle (en abrégé Boc) et on débloque cet atome d'azote amino pour obtenir le produit de degré de polymérisation 1, sur lequel on refera un couplage avec l' amino acide bloqué pour obtenir après débloquage de l'azote terminal le produit de degré de polymérisation 2 et ainsi de suite.

Pour obtenir les lipopeptides selon l'invention, on peut aussi polymériser le N-carboxy-anhydride

(en abrégé NCA) de l'amino acide en initiant la polymérisation par l'amine grasse  $C_nNH_2$ . On réalise ensuite, si on le désire, un fractionnement en composition (la séquence lipidique étant monodispersée), par précipitation sélective des lipopeptides, et on obtient une série de lipopeptides qui diffèrent par leur composition en peptides.

Les peptides monomères mis en oeuvre sont des produits commerciaux ou sont préparés de manière connue.

Le monomère utilisé pour la partie peptidique des lipopeptides selon l'invention n'est donc pas l'acide aminé lui-même, ce sera son dérivé cyclique, le N-carboxy-anhydride d'amino-acide (NCA), obtenu par action du phosgène sur l'amino acide selon la réaction:



25 ou l'acide aminé N protégé par un des groupes habituellement utilisés en synthèse peptidique.

On prépare les NCA dans le THF, en faisant réagir sur l'amino acide une solution de phosgène dans le tétrahydrofurane (THF). Cette méthode est une variante de la méthode de Fuller, Verlander et Goodman (Biopolymers, 15 (1869/1976), dans laquelle le solvant du phosgène est le benzène.

30 L'amine grasse  $C_nNH_2$  est soit une amine commercialement disponible, soit obtenue à partir de l'acide gras ayant un atome de carbone de plus par

la réaction de dégradation de Schmidt utilisant l'azide de sodium en milieu acide fort [Indian J. Technol., 5, 262 (1967)], soit obtenue par couplage entre le chlorure d'acide acrylique ou méthacrylique et une diamine primaire, ou un amino alcool N protégé. Le choix d'une chaîne C<sub>n</sub> ayant de 8 à 24 atomes de carbone environ n'est pas critique, mais tient uniquement à la plus grande disponibilité des produits correspondants. Cette chaîne hydrophobe C<sub>n</sub> peut être une chaîne hydrocarbure quelconque, mais elle peut aussi comporter des substituants et/ou des hétéro-atomes, pour autant qu'ils n'influent pas défavorablement sur le processus de synthèse.

On décrit ci-après, en référence à la nomenclature exposée au tableau I, successivement la préparation de lipopeptides hydrophobes et leur transformation en lipopeptides amphipatiques, et la préparation directe de lipopeptides amphipatiques.

#### A-1 Synthèse de lipopeptides hydrophobes (C<sub>n</sub>E<sub>b</sub><sub>p</sub>, C<sub>n</sub>D<sub>b</sub><sub>p</sub> et C<sub>n</sub>K<sub>t</sub><sub>p</sub>)

On dissout l'amine grasse (C<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>) dans le chloroforme, puis on ajoute le NCA d'acide aminé approprié et on laisse polymériser à la température ambiante, sous agitation, pendant deux jours. On obtient ainsi les lipopeptides C<sub>n</sub>E<sub>b</sub><sub>p</sub> possédant une séquence peptidique de poly(glutamate de benzyle), C<sub>n</sub>D<sub>b</sub><sub>p</sub> possédant une séquence peptidique de poly(aspartate de benzyle) et C<sub>n</sub>K<sub>t</sub><sub>p</sub> possédant une séquence peptidique de polytrifluoroacétyllysine.

A titre d'exemple, pour la synthèse de lipopeptides C<sub>17</sub>K<sub>t</sub><sub>p</sub>, on utilise de l'heptadécyamine C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>NH<sub>2</sub> obtenue à partir de l'acide stéarique (voir Indian J. Technol. 5, 262 (1967)). Pour obtenir plus précisément du C<sub>17</sub>K<sub>t</sub><sub>10</sub> de degré de polymérisation 10 (DP = 10), on ajoute à 2,55g (0,01 mole) d'amine en C<sub>17</sub> en solution dans 150 ml de chloroforme, 27g (0,1 mole) de NCA de trifluoroacétyllysine et on laisse polymériser à température ambiante sous agitation pendant plusieurs heures. Le

chloroforme est ensuite évaporé, le résidu est repris dans le méthanol et le polymère est précipité dans l'eau, puis est filtré, lavé et séché.

5 A-2 Transformation de lipopeptides hydrophobes en lipopeptides amphipatiques

1. Lipopeptides  $C_nK_p$

On a préparé les lipopeptides  $C_nK_p$  possédant une séquence hydrophile de polylysine (K) à partir des lipopeptides  $C_nKt_p$  par la méthode de Sela et al.

10 [Biopolymers, 1, 517 (1963)]. On traite les lipopeptides  $C_nKt_p$  en solution dans le THF, d'abord par une solution de pipéridine dans le méthanol, puis par une solution de pipéridine dans l'eau.

15 A titre d'exemple illustrant une transformation de  $C_{17}Kt_p$  en  $C_{17}K_p$ , 5g de  $C_{17}Kt_p$  sont dissous dans 150 ml d'une solution molaire de pipéridine dans le méthanol à température ambiante. Après 2 heures, on ajoute 100 ml d'une solution molaire de pipéridine dans l'eau et on laisse 48 heures à température ambiante.

20 20 On élimine le méthanol à l'évaporateur et on passe la solution aqueuse sur une colonne de résine échangeuse d'anions (Duolite A 102 D, forme  $OH^-$ ) pour en éliminer les anions trifluoroacétate et on lyophilise l'éluat pour récupérer le  $C_{17}K_p$ .

25 2. Lipopeptides  $C_nE_p$  et  $C_nD_p$

On obtient les lipopeptides  $C_nE_p$  possédant une séquence hydrophile d'acide poly-glutamique (E) et  $C_nD_p$  possédant une séquence hydrophile d'acide poly-aspartique (D) à partir des lipopeptides  $C_nEb_p$  et  $C_nDb_p$  en traitant ces lipopeptides par HCl et HBr à température ambiante [J. Am. Chem. Soc., 80; 4631 (1958)].

### 3. Lipopeptides $C_nEp_p$

On prépare les lipopeptides  $C_nEp_p$  possédant une séquence hydrophile de poly-hydroxypropylglutamine (Ep) en traitant les lipopeptides  $C_nEb_p$  par l'aminopropanol à 60°C en solution dans le dioxane [Biopolymers, 3, 625 (1965)].

### 4. Lipopeptides $C_nEe_p$

On prépare les lipopeptides  $C_nEe_p$  possédant une séquence hydrophile de poly-hydroxyéthylglutamine (Ee) en traitant les lipopeptides  $C_nEb_p$  par l'éthanolamine à 60°C en solution dans le dioxane [Biopolymers, 9, 717 (1970)].

## B - Synthèse directe de lipopeptides amphipatiques

On dissout l'amine grasse  $C_nNH_2$  dans le chloroforme, puis on ajoute le NCA d'acide aminé et on laisse polymériser, à température ambiante, sous agitation, pendant deux jours. On obtient ainsi les lipopeptides  $C_nSar_p$  possédant une séquence peptidique de polysarcosine.

Pour illustrer plus concrètement le procédé de synthèse de lipopeptides selon l'invention, on décrit ci-après la synthèse des lipopeptides amphipatiques  $C_{17}Sar_p$  formés d'une chaîne aliphatique contenant 17 atomes de carbone (C17) et d'une chaîne de polysarcosine (Sar)<sub>p</sub> et celle de C12 Sar<sub>20</sub> et de C18 Sar<sub>11</sub>.

### 1. Synthèse de lipopeptides de degré de polymérisation supérieur à 3

#### a) Synthèse de C17 Sar<sub>20</sub>

L'heptadécylamine (C17 NH<sub>2</sub>) obtenue à partir de l'acide stéarique [voir Indian J. Technol., 5, 262 (1967)] est d'abord dissoute dans le chloroforme, puis

on y ajoute la quantité de NCA de sarcosine calculée pour obtenir le degré de polymérisation choisi. Par exemple, si on veut obtenir du C17 Sar<sub>10</sub> de degré de polymérisation 10 (DP:10), à 2,55g (0,01 mole) d'amine 5 C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>NH<sub>2</sub> en solution dans 100 ml de chloroforme, on ajoute 11,5g de NCA de sarcosine (0,1 mole) et on laisse polymériser à température ambiante, sous agitation pendant 48 heures.

On fractionne les lipopeptides C17 Sar<sub>p</sub> 10 par précipitation fractionnée en utilisant le diméthylformamide comme solvant et l'acétone comme précipitant.

b) Synthèse de C12 Sar<sub>20</sub>

On ajoute 23g (0,2 mole) de NCA de sarcosine 15 à 1,85g (0,01 mole) de dodécyamine en solution dans 100 ml de chloroforme et on laisse polymériser à température ambiante, sous agitation, pendant 48 heures. On peut fractionner les lipopeptides C12 Sar<sub>p</sub> par précipitation fractionnée en utilisant les solvants précipitants diméthylformamide/acétone. 20

On obtient xg du produit cherché solide blanc dont on a déterminé le degré de polymérisation par dosage de la fonction amine terminale après avoir vérifié le degré de pureté par chromatographie.

25 c) Synthèse de C18 Sar<sub>11</sub>

préparé en appliquant les mêmes conditions opératoires que selon b) avec 0,11 mole de NCA de sarcosine (12,65g) et 0,01 mole de C18 NH<sub>2</sub> (2,69g), dans 100 ml de chloroforme on obtient le C18 Sar<sub>11</sub> avec un rendement supérieur à 80%, dont le spectre infrarouge dans le KBr est l'objet de la figure 1.

2. Synthèse de lipopeptides de degrés de polymérisation 1, 2 et 3

Pour obtenir des lipopeptides de degrés de polymérisation 1, 2 et 3, on peut procéder par couplage peptidique entre l'amine grasse et l'aminocide N-protegé par le groupement tert-butyl-oxycarbonyle (Boc).

Les Boc-aminocides sont préparés à partir de l'aminocide et du di-tert-butyl-dicarbonate par la méthode de Morsder et al [Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357, 1651 (1976)].

10 a) Synthèse de C17 Sar<sub>1</sub>

a) C17BocSar<sub>1</sub> : on obtient le produit C17BocSar<sub>1</sub> en couplant l'heptadécyldiamine au BocSar<sub>1</sub> en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCCI). On mélange à froid (à 0°C), dans 100 ml de chloroforme, 3,78g (0,02 mole) de BocSar et 2,06g (0,01 mole) de DCCI. Il se forme un précipité abondant de dicyclohexylurée (DCU). On laisse 30 minutes à 0°C sous agitation et on ajoute 2,55g (0,01 mole) d'heptadécyldiamine. On laisse la réaction se poursuivre pendant 20 heures. On filtre, on lave le précipité, on récupère le filtrat, on évapore le chloroforme, on reprend le résidu dans 50 ml de THF, on refroidit à 0°C, on filtre pour éliminer le maximum de dicyclohexylurée, et on lave le précipité avec un minimum de THF froid.

25 b) C17Sar<sub>1</sub>, HCl : au filtrat, on ajoute 20 ml d'HCl en solution 5N dans du THF et on laisse sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. Il se forme un précipité abondant de C17Sar<sub>1</sub>, HCl, qu'on filtre et lave au THF.

c) C17Sar<sub>1</sub> : on reprend le précipité dans 100 ml de THF et on chauffe à 50°C, puis on ajoute 2 ml de triéthylamine et on laisse reposer pendant 2 heures. On refroidit à 0°C, on filtre le précipité de chlorhydrate de triéthylamine, on évapore le THF et on recristallise le C17Sar<sub>1</sub> dans l'acétone.

On obtient 2,1g de C17Sar<sub>1</sub> (rendement 65%).  
F = 58° C

b) Synthèse de C17Sar<sub>2</sub>

5 Pour obtenir du C17Sar<sub>2</sub>, on opère de la même manière, mais on part de C17Sar<sub>1</sub> et de BocSar.

F = 74° C

c) Synthèse de C17Sar<sub>3</sub>

10 Pour obtenir du C17Sar<sub>3</sub>, on opère de la même manière, mais on part de C17Sar<sub>2</sub> et de BocSar.

F = 83° C

d) Synthèse de C12Sar<sub>1</sub>

— préparation de C12 Sar Boc

15 On dissout dans 100 ml de chloroforme, 1,85g (0,01 mole) de dodécyamine, 1,89g (0,01 mole) de Sar Boc et 1,15g (0,01 mole) de N-hydroxysuccinimide puis on ajoute, sous agitation, 2,06g de dicyclohexylcarbodiimide et maintient l'agitation pendant 24 heures.

20 On élimine alors le précipité de dicyclohexylurée, évapore le solvant du filtrat et reprend le résidu dans 100 ml d'acétone pour éliminer le reste de dicyclohexylurée solide. Le produit recherché précipite lorsqu'on ajoute au filtrat un volume d'eau. Après lavage 25 du précipité par un mélange acétone/eau, on obtient xg de C12 Sar Boc.

— préparation du chlorhydrate de C12 Sar

Le produit précédemment obtenu est dissous dans 80 ml de THF; on ajoute 20 ml d'acide chlorhydrique 30 5N en solution dans l'éther diéthylique et abandonne 24 heures à température ambiante pendant lesquelles le chlorhydrate final précipite. On l'isole par filtration à 0°C, le lave au THF glacé et le sèche sous vide. On obtient ainsi le C12 Sar, HCl.

— isolement de C12 Sar<sub>1</sub>

Le sel précédemment obtenu est dissous dans 50 ml de méthanol; on ajoute 100 ml de solution aqueuse 0,1N de soude et on évapore les solvants sous vide à température ambiante jusqu'à 25 ml environ. 5 On verse cette solution dans 100 ml d'eau et extrait la phase aqueuse par 100 ml d'acétate d'éthyle puis par 50 ml du même solvant. Les phases organiques sont réunies et séchées sur sulfate de sodium. Le solvant 10 est alors éliminé sous vide à 0°C.

Le résidu est purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice, avec comme éluant une solution de méthanol contenant 1% en volume de solution aqueuse d'ammoniaque (à 30% environ).

15 On obtient ainsi 2,05g de C12 Sar<sub>1</sub> de point de fusion 39°C.

e) Synthèse de C12 Sar<sub>2</sub> et C12 Sar<sub>3</sub>

On applique le même procédé que celui décrit 20 pour la synthèse de C12 Sar<sub>1</sub>, mais en utilisant comme matière première respectivement le C12 Sar<sub>1</sub> et le C12 Sar<sub>2</sub>.

Les rendements sont comparables.

C12 Sar<sub>2</sub> : point de fusion 58°C.  
25 C12 Sar<sub>3</sub> : point de fusion 66-67°C.

f) Synthèse des C16 Sar<sub>1,2,3</sub>

On applique les modes opératoires décrits 30 selon d) et e) pour préparer ces dérivés dont les spectres infra-rouges (en KBr) sont représentés respectivement aux figures 2, 3 et 4.

g) Synthèse de C18 Sar<sub>2</sub>

On ajoute par petites portions à une solution 35 de 2,69g (0,01 mole) d'octadécylamine dans 150 ml de chloroforme, 2,3g (0,02 mole) de NCA de sarcosine,

sous bonne agitation. On élimine alors le solvant, on dissous le résidu dans l'éther diéthylique puis l'élimine sous vide à température voisine de 0°C.

On obtient 4g de produit dont le degré de polymérisation moyen, déterminé par dosage de la fonction amine terminale par l'acide perchlorique dans l'acide acétique est très voisin de 2.

Par chromatographie sur colonne de gel de silice en éluant avec du méthanol contenant 1% de solution aqueuse concentrée d'ammoniaque, on sépare du C18 Sar<sub>1</sub>, C18 Sar<sub>2</sub>, C18 Sar<sub>3</sub>, C18 Sar<sub>4</sub> pour obtenir plus de 60% de C18 Sar<sub>2</sub>. Il y a aussi un peu de C18 Sar<sub>5</sub> et une trace de C18 Sar<sub>6</sub> avec un reste d'amine de départ.

Le C18 Sar<sub>2</sub> ainsi obtenu, même non séparé de ses homologues, a des propriétés émulsifiantes comparables à celles du C18 Sar<sub>2</sub> obtenu par la méthode au Sar Boc.

La structure des lipopeptides selon l'invention a été étudiée par la technique de diffraction aux rayons X.

On a ainsi pu établir que les lipopeptides amphipatiques présentent des mésophases à structure périodique en solution aqueuse pour des concentrations en eau inférieures à 60% environ et que la structure périodique peut être conservée à l'état sec par évaporation lente de l'eau de la mésophase. Les lipopeptides amphipatiques selon l'invention constituent ainsi une nouvelle classe de cristaux liquides liotropes et ils peuvent avoir les mêmes applications que ces cristaux liquides.

La structure des lipopeptides amphipatiques est maintenant décrite plus en détails en référence à l'exemple des lipopeptides C17 Sar<sub>p</sub> constitués d'une chaîne aliphatique possédant 17 atomes de carbone et d'une chaîne de polysarcosine, dont on a fait varier le degré

de polymérisation de 1 à 60.

Les lipopeptides C17 Sar<sub>p</sub> présentent un double polymorphisme: en fonction de la longueur de la chaîne polypeptidique d'une part et en fonction de la teneur en eau d'autre part. Les lipopeptides adoptent, suivant leur composition, trois types de structures : lamellaires pour les degrés de polymérisation (DP) inférieurs à 9, hexagonale pour les DP compris entre 10 et 35 environ et cubique centrée pour les DP supérieurs à environ 35. De plus, les lipopeptides peuvent présenter un polymorphisme en fonction de la teneur en eau de leurs mésophases. L'addition d'eau modifie le rapport entre les volumes des phases hydrophile et hydrophobe et peut faire passer la structure de lamellaire à hexagonale (pour les DP compris entre 5 et 9 environ) ou d'hexagonale à cubique (pour les DP compris entre 17 et 35 environ).

L'invention a donc également pour objet l'application des lipopeptides amphipatiques à la constitution de cristaux liquides liotropes.

Les mésophases de lipopeptides amphipatiques peuvent en outre incorporer de nombreux composants, tant hydrophiles qu'hydrophobes, tels que : alcools, acides, paraffines, huile de carnation, stéarate d'éthyle, palmitate d'isopropyle, etc., et donner ainsi par exemple des laits ou des crèmes, dont on peut faire varier facilement la viscosité en jouant sur la structure des mésophases, elle-même déterminée par la longueur respective des séquences hydrophobes et peptidiques des lipopeptides.

On a également testé les propriétés émulsifiantes des lipopeptides amphipatiques vis-à-vis de nombreux couples de liquides non miscibles tels que eau/hydrocarbures et eau/produits de base de l'industrie des cosmétiques. On a étudié le type et la stabilité des

émulsions obtenues par la méthode des colorants sélectifs, la méthode des dilutions, la conductivité électrique, la cryofracture et la microscopie électronique.

Pour obtenir des émulsions, on ajoute aux deux liquides non miscibles environ 1% en poids de 5 lipopeptide amphipatique ( $C_nSar_p$ , avec  $n = 16, 17$  ou  $18$  et  $p = 1, 2$  ou  $3$  par exemple), on agite 10 à 15 minutes et l'émulsion se forme facilement. On a ainsi préparé des émulsions de différentes compositions, de 30 à 70% de chaque composant, avec les systèmes eau/octane, 10 eau/myristate d'isopropyle, eau/palmitate d'isopropyle, eau/stéarate de butyle ou d'éthyle, eau/huile de carnation, eau/huile de vaseline, eau/cosbiol, eau/myglolio). Les émulsions obtenues sont très stables (plusieurs mois) et résistent à des élévarions de température 15 jusqu'à  $60^{\circ}C$  environ. On modifie la viscosité, la compacité et l'onctuosité des émulsions en faisant varier la teneur en lipopeptides entre 1 et 2%.

L'invention a donc en outre pour objet l'application des lipopeptides amphipatiques comme 20 émulsifiants et les émulsions comprenant des lipopeptides amphipatiques à titre d'agent émulsifiant, présent en une quantité de l'ordre de 1% en poids ou plus.

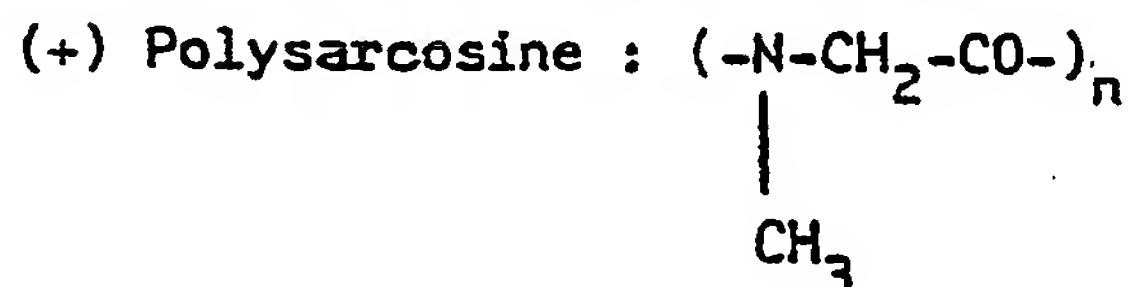
On peut faire varier à volonté la solubilité et l'affinité pour différents solvants des lipopeptides en modifiant le nombre d'atomes de carbone de 25 la chaîne hydrophobe et sur la nature de la chaîne peptidique. On peut aussi modifier facilement la balance hydrophile-hydrophobe de tels lipopeptides en modifiant le nombre d'atomes de carbone de la chaîne hydrophobe 30 et le degré de polymérisation de la chaîne peptidique.

Les lipopeptides amphipatiques selon l'invention donnent facilement des émulsions très stables pour des teneurs en lipopeptides très faibles (environ 1% en poids) alors qu'il est nécessaire d'avoir 15-16% 35 des agents de surface classiques. De plus, ils ont

l'avantage d'être réalisés avec des composants naturels (lipides et peptides). Ces lipopeptides amphipatiques peuvent trouver une application comme agents émulsifiants de milieux non miscibles dans des domaines très divers, 5 par exemple dans l'industrie cosmétique (crèmes hydratantes, crèmes antirides, vernis, dissolvants de vernis, etc.), dans l'industrie alimentaire (moutardes, mayonnaises, etc.) et dans l'industrie pétrolière (additifs pour huiles, récupération assistée de pétrole), entre 10 autres.

TABLEAU I  
Nomenclature des séquences peptidiques

Désignation	Nom du polypeptide	Formule de la chaîne latérale
Eb	Poly(glutamate de benzyle)	$-(\text{CH}_2)_2\text{-COO-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$
Ep	Poly(hydroxypropylglutamine)	$-(\text{CH}_2)_2\text{-CO-NH-(CH}_2)_3\text{OH}$
Ee	Poly(hydroxyéthylglutamine)	$-(\text{CH}_2)_2\text{-CO-NH-(CH}_2)_2\text{OH}$
E	Poly(acide glutamique)	$-(\text{CH}_2)_2\text{-COOH}$
Db	Poly(aspartate de benzyle)	$-\text{CH}_2\text{-COO-CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$
D	Poly(acide aspartique)	$-\text{CH}_2\text{-COOH}$
Kt	Poly(trifluoroacétyllysine)	$-(\text{CH}_2)_4\text{-NH-CO-CF}_3$
K	Polylysine	$-(\text{CH}_2)_4\text{-NH}_2$
S	Polysériste	$-\text{CH}_2\text{-OH}$
T	Polythréonine	$-\text{CH-OH}$   $\text{CH}_3$
Sar	Polysarcosine (+)	



REVENDICATIONS

1. Lipopeptides, caractérisés en ce qu'ils sont amphipatiques et sont constitués d'une chaîne hydrophobe comprenant de 8 à 24 atomes de carbone environ 5 terminée par un groupement amino engagé dans une liaison amide avec le groupe carboxyle terminal d'une chaîne polypeptidique hydrophile ou rendue hydrophile.

2. Lipopeptides selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule générale:

10  $C_nPP$

dans laquelle  $C_n$  représente une chaîne hydrophobe ayant de 8 à 24 atomes de carbone environ, et PP représente un polypeptide obtenu à partir des acides aminés naturels ou de leurs dérivés.

15 3. Procédé pour l'obtention de Lipopeptides selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il consiste fondamentalement à:

20 1) réaliser un couplage peptidique entre une amine grasse et un amino acide N-protégé, pour obtenir un lipopeptide dont la chaîne peptidique a un degré de polymérisation de 1 et, si l'on désire obtenir un degré de polymérisation de 2 ou 3 pour la chaîne peptidique, réaliser un autre couplage peptidique d'un amino acide N-protégé 25 sur le produit de degré de polymérisation immédiatement inférieur, ou

30 2a) effectuer la polymérisation du N-carboxy-anhydride de l'amino acide en l'initiant par l'amine grasse  $C_nNH_2$ , et

35 2b) si on le désire, fractionner en composition les lipopeptides de l'étape 2a), et

3) excepté dans le cas où la chaîne peptidique du produit de l'étape 1) et/ou 2a) ou 2b) est directement une chaîne hydrophile, débloquer les chaînes latérales de la chaîne peptidique hydrophobe pour les rendre hydrophiles.

4. Procédé selon la revendication 3 pour l'obtention de lipopeptides ayant un degré de polymérisation de 1, 2 ou 3, caractérisé en ce qu'on effectue un couplage peptidique entre une amine grasse de formule  $C_nNH_2$  où  $C_n$  est tel que précédemment défini, et l'acide dont l'atome d'azote amino est protégé, par exemple par le groupement tert-butyl-oxycarbonyle, obtenant ainsi un lipopeptide ayant un degré de polymérisation de 1, et pour obtenir des lipopeptides ayant un degré de polymérisation de 2 ou 3 pour la chaîne peptidique, on réalise un autre couplage peptidique d'un amino acide N-protégé sur le produit de degré de polymérisation immédiatement inférieur.

5. Procédé selon la revendication 3 pour l'obtention de lipopeptides, caractérisé en ce qu'on polymérisé le N-carboxy-anhydride de l'acide amino en initiant la polymérisation par une amine grasse  $C_nNH_2$  où  $C_n$  est tel que précédemment défini, et on réalise ensuite, si on le désire, un fractionnement en composition par précipitation sélective des lipopeptides, obtenant ainsi une série de lipopeptides qui diffèrent par leur composition en peptides.

6. Application des lipopeptides selon la revendication 1 ou 2 à l'obtention de cristaux liquides liotropes.

7. Cristaux liquides, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un lipopeptide selon la revendication 1 ou 2.

8. Application des lipopeptides selon la revendication 1 ou 2 comme émulsifiants.

9. Emulsions de milieux non miscibles, caractérisées en ce qu'elles comprennent, au moins 0,8% environ d'un lipopeptide selon la revendication 1 ou 2.

0105777

1/4

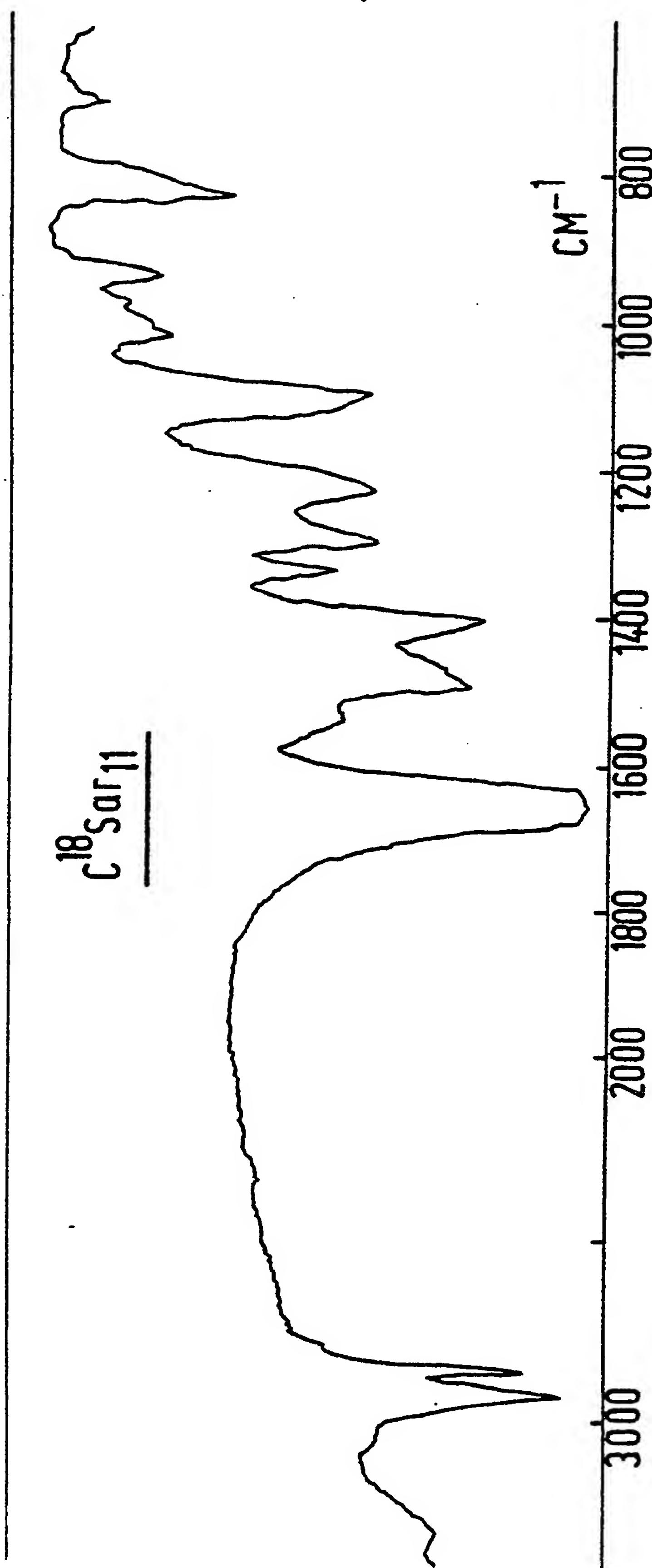


FIG. 1

0105777

2/4

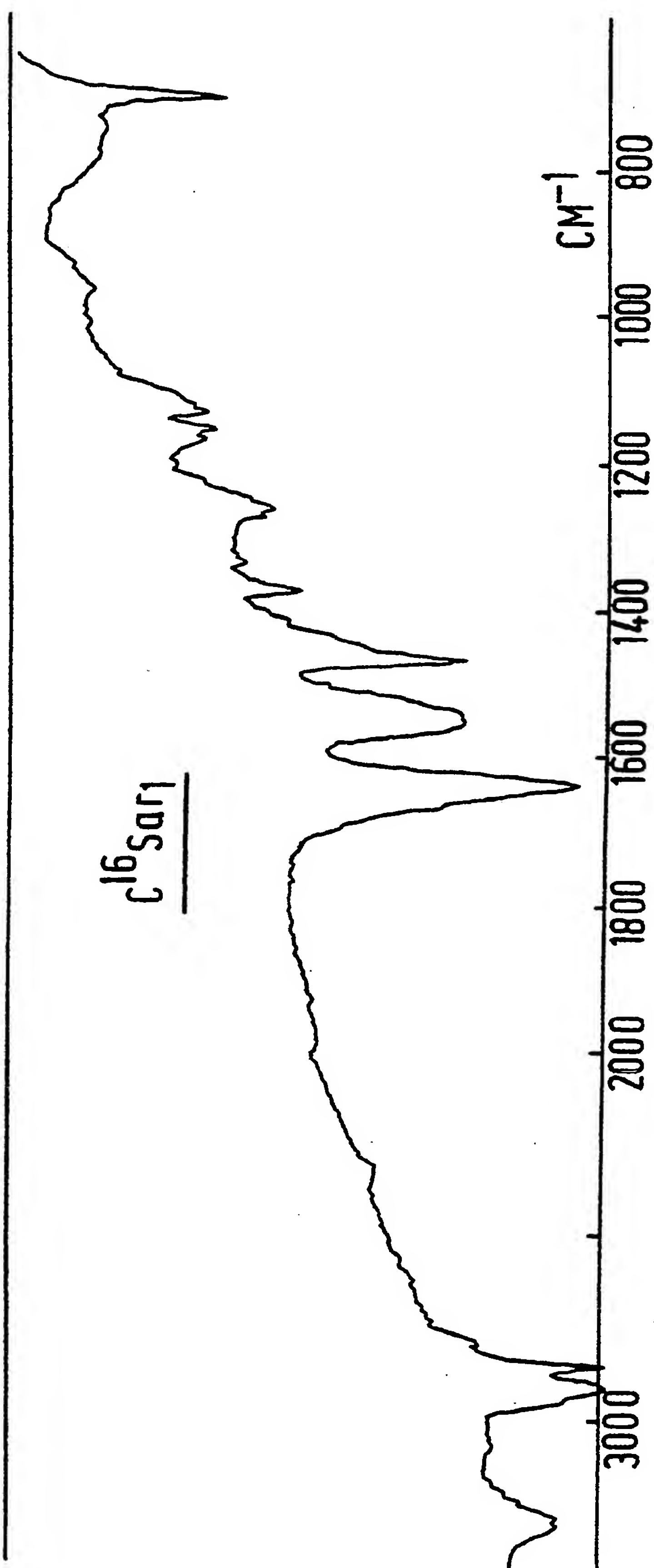


FIG. 2

1045PR

0105777

3/4

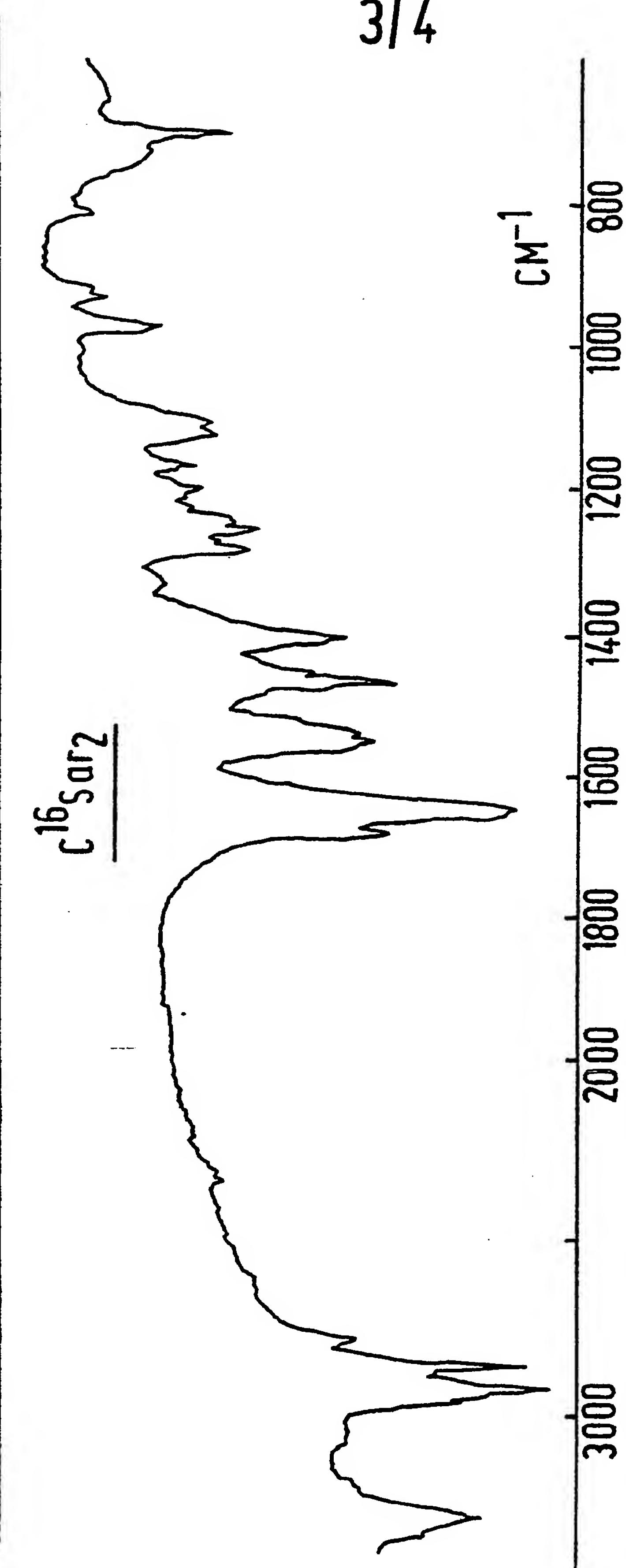


FIG. 3

7043FR

0105777

4/4

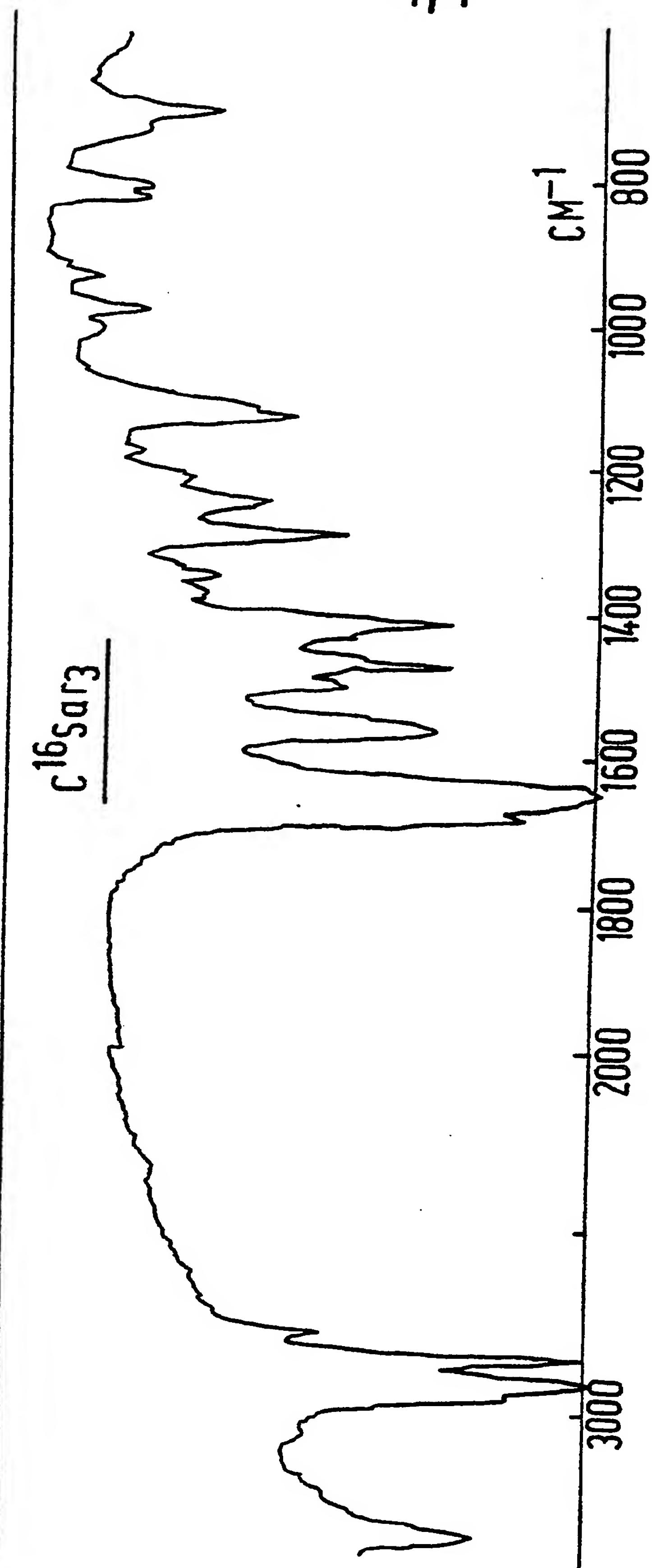


FIG. 4



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl. 5)
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 97, no. 23, 1982, page 2, no. 192611x, Columbus, Ohio, USA</p> <p>G.H. WERNER et al.: "Low molecular weight synthetic lipopeptides: a new class of immunopotentiating substances" &amp; DEV. IMMUNOL. 1982, 17(Curr. Concepts Hum. Immunol. Cancer Immunomodulation), 645-652 *</p> <p>Abrégé *</p> <p>---</p>	1-3	<p>C 07 C 103/52 C 08 G 69/08 C 09 K 3/34</p>
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 73, 1970, page 4, no. 116276f, Columbus, Ohio, USA</p> <p>N.K. GARG et al.: "Amino acid containing lipids: lipoamine acids, peptidolipids, and proteolipids" &amp; J. SCI. IND. RES. 1970, 29(4), 197-202 *</p> <p>Abrégé *</p> <p>---</p>	1-3	<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 5)</p>
A	<p>MOL. CRYST. LIQ. CRYST., vol. 63, 1981, pages 205-214, Gordon and Breach Science Publishers, Inc., USA</p> <p>K. CZARNIECKA et al.: "Polypeptide liquid crystals: A deuterium NMR study"</p> <p>-----</p>	1,6	<p>C 07 C 103/00 C 08 G 69/00 C 09 K 3/00</p>
<p>Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications</p>			
Lieu de la recherche LA HAYE	Date d'achèvement de la recherche 02-01-1984	Examinateur RAJIC M.	
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>&amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**